Aus der Chirurgischen Klinik der Universität Bern

Leitung: Prof. Dr. med. K. Lenggenhager

UEBER DIE VERHINDERUNG DER CALCIUMOXALAT-AUSFAELLUNG DURCH ZITRAT

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlanung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Universität Bern

vorgelegt von

Alfred Spiro

von North Bergen, New Jersey, USA

ARNAUD DRUCK BERN 1956

Von der Medizinischen Fakultät auf Antrag des Herrn Prof. Dr. K. Lenggenhager zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 13. Juni 1956

Der Dekan der Medizinischen Fakultät:

Prof. Dr. med. W. Wilbrandt

EINLEITUNG

Seit den Untersuchungen von Hastings und Mitarbeitern (1) im Jahre 1926, ist es bekannt, dass Calcium durch Zitronensäure komplex gebunden wird. Shohl (2, 3) und andere Forscher (4) machten die Beobachtung an Tierexperimenten in den 30er Jahren, dass eine Zugabe von Zitrat zu einer rhachitogenen Diät es ermöglichte, die experimentelle Rhachitis zu heilen. Die Resultate wurden mit histologischen Untersuchungen und Röntgenaufnahmen belegt, ohne dass eine genaue Erklärung hierfür gegeben wurde. Im Jahre 1944 stellte Rominger (5) an Kindern fest, dass 8 bis 10 g Natriumzitrat pro Tag genügen, um in 3 bis 6 Wochen eine floride Rhachitis zur Ausheilung zu bringen. Andere organische Säuren zeigten keine zuverlässige Wirkung. Rominger gab damals zu, dass die Rolle der Zitronensäure in Mineralstoffwechsel keineswegs klar sei, versuchte jedoch die Wirkung mit den Hypothesen zu erklären, dass die Zitronensäure die Resorption des Calciums im Darm verbessert, dass die Säure einen hindernislosen Transport des Calciums in die Blutbahn erlaubt, und dass der Komplex eine raschere Ablagerung in den Knochen selbst verursacht.

Glanzmann, Meier und Walthard (6) machten auch experimentelle und klinische Untersuchungen über die Heilungs- und Verhütungsmöglichkeit von Rhachitis durch Zitronensäure. Diese Forscher versuchten 1946 den Mechanismus der antirhachitischen Wirkung folgendermassen zu erklären:

Sie glaubten, dass das Calcium mit dem Zitrat einen löslichen Komplex bilde, in welchem es nicht mehr positiv ionisiert werden könne und infolgedessen nicht mehr durch Phosphat als unlösliches Calciumphosphat ausgefällt würde. Ferner vertraten sie ebenfalls die Meinung, dass der Kalk infolge Verbrennung der Zitronensäure in den Knochen wieder frei und zur Ablagerung und Bildung von Apatit fähig werde.

In der Literatur aber gibt es viele Diskrepanzen über die Erfolge mit Zitration. Day (7) zeigte in Versuchen mit normalen Ratten, dass gute Erfolge, d.h. vermehrte Calcium-Resorption und -Ablagerung in den Knochen und verminderte Calciumausscheidung (in den amerikanischen Arbeiten als Retention bezeichnet) dann beobachtet werden, wenn das Verhältnis Calcium zu Phosphor in der Diät beträchtlich ist. Watson, et al (8) stellten keine Zunahme der Calcium-Resorption oder Abnahme der Calcium-Ausscheidung fest, nachdem sie bei acht Kindern Orangensaft, Ascorbinsäure oder Kaliumzitrat (3,3 g täglich) über 16 Wochen verabreicht hatten. Andere amerikanische Autoren, Steggerda und Mitchell (9) gaben 4,5 g Kaliumzitrat zusammen mit 4,5 g Zitronensäure, oder 9 g Kaliumzitrat allein täglich, wobei sie aber keine konstante Erhöhung der Calcium-Resorption durch Zitration bei normalen Erwachsenen erzielen konnten. Mallon und Mitarbeiterinnen (10, 11, 12) studierten die Wirkung von Grapefruit- bzw. Orangen- bzw. Zitronensaft in Versuchen mit Ratten. Eine Serie der Tiere bekam Kontrolldiät und eine andere Serie Diät mit bestimmten Mengen von

Calcium. Nur die mit Grapefruitsaft gefütterten Tiere zeigten eine vermehrte Calciumretention von 7 % über die Kontrolltiere. Der Gehalt an Zitronensäure in kalifornischen Grapefruits war nach Angaben der Autoren 1,61 %, in Orangen 1,05 % und in den Zitronen 6,21 %. Gordonoff und Minder (13) machten Versuche mit Calciumisotop Ca^{45} an rhachitischen und mit Zitronensäure geheilten Ratten. Diese Forscher behandelten Tiere mit Ca^{45} bei einer normalen Diät, bzw. bei einer rhachitogenen Diät, bzw. bei einer rhachitogenen Diät mit Zugabe von Zitrat. Mit einer Messung der Radioaktivität in den Zähnen und in den langen Röhrenknochen der Tiere hat man gezeigt, dass die rhachitischen Ratten eine starke Abnahme des Calciumstoffwechsels aufwiesen. Trotz der Tatsache, dass die Zitratzugabe die Reaktion zu heilen vermochte, - auch in histologischen Untersuchungen-, konnte diese Zitratzugabe die Reduktion des Calciumumsatzes nicht erhöhen. Dieselben Forscher waren auch der Meinung, dass die Ursache der Wirkung von Zitronensäure bei der experimentellen und klinischen Rhachitis noch nicht völlig geklärt sei. In einer späteren Publikation über andere Versuche mit Calciumisotop Ca^{45} nahmen Gordonoff und Minder (14) an, die Zitronensäure wäre imstande, die Rhachitis anders zu beeinflussen als das Vitamin D. Mit der Messung der Radioaktivität zeigten sie, dass Vitamin D im Gegensatz zur Zitronensäure den Calciumstoffwechsel in Zähnen und Knochen steigert, wobei aber die genaue Wirkung des Zitrations noch immer unerklärt blieb.

Theopold und Hennig (15) studierten die Wirkung der Zitronensäure an der Löslichkeit von Calciumphosphat. Sie stellten fest, dass Zitronensäure-Zugabe die Löslichkeit von $CaHPO_4 \cdot 2\,H_2O$ in steigenden Mengen verbessert. Sie zeigten auch, dass Lösungen in einem Verhältnis von 4 Mol Zitronensäure zu 1 Mol $CaHPO_4$ sich längere Zeit klar aufbewahren lassen. Zwei Jahre später gaben dieselben Autoren (16) an, dass Calcium und Zitrat im Molverhältnis 1 : 1 zusammentreten müssten, um das komplexe Ion zu bilden. Dieser Komplex kann unabhängig vom pH-Wert auftreten, wenn Calcium und Zitrat miteinander reagieren können, aber das Maximum an Komplex liegt gerade im stärker sauren Gebiet. In der früheren Arbeit (15) schrieben Theopold und Hennig, es müsste, um einen biologischen Nutzeffekt zu erreichen, d.h., um einen Anstieg des Blutcalciums und Aufbau an Knochensubstanz und kein Absinken der Blutcalciumgehalte mit eventuell tetanischen Erscheinungen zu bekommen, in dem Zitronensäure-Calcium-Komplex eine optimale Phosphatmenge vorhanden sein.

Von Schmahl und Hennig (17) stammt die Ansicht, dass bei der Einwirkung von Alkalizitrat auf Calciumcarbonat das Calcium in Form des Ions $CaCit^-$ in Lösung geht.

Untersuchungen von alimentärer Osteoporose im Zusammenhang mit einer abnormen Säuerung des Bodens und bestimmter Quellen durch Sulfate in gewissen Gebieten Graubündens wurden von Glanzmann, Meier und Uehlinger (18) gemacht. Mit Röntgenaufnahmen und chemischen Analysen wurde gezeigt, dass die Rippen der Versuchstiere kalkärmer waren als diejenigen der Kontrolltiere. Die Erklärung dieser Forscher ist nun folgende:

Da Sulfate mit Calcium das schwer lösliche Calciumsulfat bilden, ist die Resorption des Calciums gehindert, was zu einer Osteoporose führe.

Auch ist es theoretisch möglich und wurde bereits nachgewiesen (19), dass andere Anionen, welche mit Calcium eine stark unlösliche Verbindung bilden, die Resorption von Calcium zu verhindern imstande sind. Zum Beispiel kann das Oxalation, das wir mit fast jeder Mahlzeit einnehmen, und welches mit Calcium das mit einem Löslichkeitsprodukt von 2×10^{-9} Calciumoxalat bildet, den Körper eben des Calciumions berauben. Hoover und Karonairatnam (20) erklärten, dass eine gewöhnliche Tasse Tee ca. 55 mg Oxalsäure enthalte, eine Menge, welche die Resorption des Calciums der Milch, die dem Tee zugegeben wird, verhindere. (Das ist aber, wie später noch gezeigt wird, eventuell nur bei anacidem Magensaft der Fall).

Andrews und Viser (21) haben den Oxalsäuregehalt in gewöhnlichen Speisesorten durch Extraktion mit Salzsäure und später Präzipitation als Calciumoxalat gemessen. Tabelle I zeigt die Resultate:

TABELLE I

"Oxalsäuregehalt verschiedener Speisearten" nach Andrews und Viser

Spinat	1,050 %
Kakao	0,908 %
Rhabarber	0,275 %
Spanische Nüssli	0,225 %
Reis	0,186 %
Schnittlauch	0,185 %
Kartoffeln	0,141 %
Rote Rüben	0,127 %
Karotten	0,060 %
Erdbeeren	0,047 %
Aepfel	0,037 %
Rosenkohl	0,037 %
Blumenkohl	0,025 %
Tomaten	0,013 %

Nach Angaben von Bonner, Hummel et al (22) wurde in Versuchen mit Kindern, welche pro Tag 100 g Spinat erhielten, kein Calcium resorbiert. (Spinat enthält 1,050 % Oxalsäure). Andere Forscher, Johnston, Mc Millen und Falconer (23), die ähnliche Untersuchungen, jedoch anstatt an Kindern an Studentinnen machten, kamen auf dieselben Resultate und waren der Meinung, dass Erwachsene Calciumoxalat ebenso schlecht wie Kinder resorbieren. Levelace, Liv und Mc Cay (24) fanden ebenfalls, dass Oxalate in verschiedenen Speisen die Resorption von Calcium hemmen, vertraten aber die

Meinung, dass Oxalatresorption eine Beziehung zum Alter der Versuchstiere habe. Sie zeigten z.B. in Tierexperimenten mit nur wenige Wochen alten Ratten, dass Oxalat eine Hemmung der Calciumresorption zu produzieren vermag, und die Menge von nicht resorbiertem Calcium ist mehr als diejenige, die stoechiometrisch mit Oxalat gebunden ist. Bei älteren Tieren zeitigte das Oxalat keine so bedeutungsvolle resorptionshindernde Wirkung an Calcium mehr, immerhin beeinflusste es die Calciumresorption auch da noch in hemmender Weise.

Es ist also nicht allein das von Speisearten kommende Oxalat, das eine hemmende Wirkung auf die Calciumresorption ausübt, sondern ebenso ist es mit dem endogen produzierten Oxalat. Crowell und Turner (25) demonstrierten, dass Oxalsäure aus der Stärke im Mund gebildet werde, und dies durch die Wirkung von menschlichem Speichelferment. Menschen mit extensiv kariösen Zähnen produzieren mehrmals so viel Säure als kariesfreie Individuen.

Man kann nun die Frage stellen, ob das Zitrat durch Bildung löslicher Komplexionen mit Calcium die resorptionshemmende Wirkung von Oxalat oder anderen Anionen aufzuheben vermöge. Durch Verabreichung von Calciumoxalat, bzw. Calciumoxalat gemischt mit Zitrat an Tiere, kann man messen, welche Tiere mehr Calcium im Körper behalten. Durch Anwendung von Calciumisotop Ca^{45}, könnte man die Calciumretention mittels Radioaktivität mit dem Geigerzähler messen.

VERSUCHE

Lenggenhager (Direktor der chirurgischen Klinik der Universität Bern) hatte die Beobachtung gemacht, dass ein frisch ausfallender Niederschlag von Calciumphosphat, Calciumoxalat oder Calciumcarbonat durch Zusatz von Natriumzitrat wieder in klare Lösung gebracht werden kann. Meine Aufgabe bestand zunächst darin, diese Beobachtungen genauer zu überprüfen. Anfänglich wurde geprüft, ob das Zitration einen Niederschlag von gewöhnlichem nicht radioaktivem Calciumoxalat wieder in Lösung zu bringen vermöchte. Bei Zimmertemperatur wurden zu 0,5 cc einer 1 %-igen Ammoniumoxalat-Lösung 0,5 cc einer verdünnten Lösung (0,05 %) Calciumchlorid zugesetzt, wodurch eine Trübung durch Bildung von Calciumoxalat entstand. Dieser Lösung und einer gleichen Kontrollösung wurden 1,5 cc einer gesättigten Natriumzitratlösung, bzw. 1,5 cc Aqua dest. beigesetzt. Das Reagensglas mit Zitrat wies eine völlige Klärung auf, wogegen dasjenige mit dem Aqua dest. immer noch eine durch Calciumoxalat getrübte Flüssigkeit zeigte. Es wurden ebenfalls eine Anzahl ähnlicher Versuche mit aufsteigenden Mengen von Calciumchlorid und Natriumzitrat gemacht, wodurch die entsprechende Erhöhung des Zitrates einen entsprechenden Niederschlag des Calciumoxalats wieder in Lösung zu bringen vermochte. Derselbe Versuch den Niederschlag und Calciumoxalat durch Natriumzitrat wieder in Lösung zu bringen,

wurde hierauf auch mit radioaktivem Ca^{45} unternommen. (Für das radioaktive Isotop, die Benützung des entsprechenden Laboratoriums, sowie für die intensive Hilfe und viele Geduld während der Arbeit, bin ich Herrn P.D. Dr. phil. W. Minder, Direktor des Radiuminstitutes der Universität Bern, zu herzlichem Dank verpflichtet.)

Zu diesem Zweck und für die späteren Tierversuche wurden nun zwei Mischungen hergestellt. Beide Mischungen enthielten 1,0 cc einer Ca^{45} Cl_2-Lösung (18 g Ca^{45} CO_3 per Liter HCl), 0,5 cc einer 2 %-igen Ammoniaklösung und 6,0 cc einer gesättigten Ammoniumoxalatlösung. Diese Menge Ammoniumoxalat genügte, um alles Ca^{45} als Calciumoxalat niederzuschlagen. Beide Mischungen waren durch Bildung von Calciumoxalat stark getrübt und wurden ca. 2 Minuten mit 3000 R.P.M. in der Zentrifuge gelassen. Nachher wurde die überstehende klare Flüssigkeit beider Mischungen weggegossen und dem ersten Zentrifugenglas 12,0 cc einer gesättigten Natriumzitratlösung, dem zweiten 12,0 cc einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung beigemischt; alsdann wurden beide Mischungen kräftig geschüttelt. Die mit Zitrat versetzte Flüssigkeit wurde fast vollständig klar, jedoch die Mischung mit physiologischer Kochsalzlösung blieb stark getrübt. Nach ca. zweiminütiger Zentrifugierung mit 3000 R.P.M. wurde die obgenannte klare Flüssigkeit auf Radioaktivität geprüft. 1/10 cc jeder Lösung wurde in kleine Schalen pipetiert und alsdann verdunsten gelassen. Mit dem Geigerzähler wurde die Radioaktivität in beiden Schalen gemessen. Die erstere war stark positiv, die zweite negativ.

Ebenfalls im Reagensglas wurde gezeigt, dass durch Anwendung einer Zitratlösung die Möglichkeit besteht, eine Oxalatlösung gegen den genannten Niederschlag mit einer Calciumchlorid-Lösung zu schützen. Zunächst wurden 2,0 cc einer 0,3 %-igen Ammoniumoxalat-Lösung mit 0,25 cc einer 3,8 %-igen Zitratlösung gemischt. 5,0 cc einer 0,05 %-igen nicht radioaktiven $CaCl_2$-Lösung konnten nachher ohne eine durch Bildung von Calciumoxalat entstehende Trübung beigemischt werden. Im Kontroll-Reagensglas mit Aqua dest. entstand jedoch sofort eine von Calciumoxalat herrührende Trübung. Auch mit radioaktivem Calcium konnte diese Schutzwirkung des Zitrations gezeigt werden. Um diese Funktion darzustellen wurden zwei Mischungen hergestellt: Beide Mischungen enthielten 5,0 cc einer radioaktiven Lösung von Ca^{45} Cl_2, welche mit 7,2 mg Ca^{45} per cc HCl hergestellt wurde, und 0,6 cc einer 25 %-igen Ammoniaklösung. Die erste Lösung bekam dann 12,4 cc einer 3,8 %-igen Natriumzitratlösung, die zweite eine 0,9 %-ige NaCl-Lösung an deren Stelle. Nachher bekamen beide Lösungen 12,0 cc einer 0,5 N Ammoniumoxalat-Lösung, was genug war, alles Ca^{45} als Calciumoxalat niederzuschlagen. Es konnte ein deutlicher Unterschied in der Trübung festgestellt werden: die Lösung mit Zitrat war viel klarer als diejenige ohne Zitrat. Beide Lösungen wurden hernach durch feines Filtrierpapier gesiebt und 0,5 cc jedes klaren Filtrates in kleine Schalen pipetiert, verdunsten gelassen und alsdann mit dem Geigerzähler auf Radioaktivität geprüft. Die erste Lösung mit Zitrat war noch ziemlich stark radioaktiv; die zweite Lösung zeigte keinerlei Aktivität.

Der Hauptteil dieser Experimente bestand aus Versuchen mit acht Meerschweinchen, von welchen jedes 290 bis 315 g wog. In diesen Tierversuchen wurde ausser der Schutzwirkung des Zitrations die Resorbierbarkeit des radioaktiven Komplexes Calciumzitratoxalats geprüft. Zunächst wurden zwei verschiedene Mischungen für die spätere Fütterung bzw. Injektion der Tiere hergestellt. Eine aus dem Labor des Herrn P.D. Dr. phil. W. Minder, Direktor des Radiuminstituts der Universität Bern, stammende radioaktive Ca^{45} Cl_2-Lösung mit ca. 19'000 counts pro cc in 4 Minuten diente als Ermittlungsquelle der Radioaktivität. In jedes der zwei Zentrifugengläschen wurden 1,0 cc der oben beschriebenen Lösung mit 0,5 cc einer 2 %-igen Ammoniaklösung und 6,00 cc einer gesättigten Ammoniumoxalatlösung gemischt und dann für ca. 2 Minuten mit 3000 R.P.M. zentrifugiert. Die in beiden Gläschen überstehende Flüssigkeit wurde weggegossen. In das erste Gläschen wurden 12,0 cc einer gesättigten Natriumzitratlösung, in das zweite 12,0 cc einer physiologischen NaCl-Lösung zugegossen und alsdann gut durchgeschüttelt. Die erste Mischung wurde fast ganz klar, die zweite jedoch blieb trüb. Beide Mischungen wurden wieder für ca. 2 Minuten mit 3000 R.P.M. in die Zentrifuge gestellt. 1/10 cc einer jeden überstehenden Flüssigkeit wurde in kleine Schalen pipetiert und mit dem Geigerzähler auf Radioaktivität geprüft. In leerer Zählkammer des Geigerzählers waren als sog. "Hintergrund", d.h. schon vorhandene Radioaktivität, 45 counts pro 4 Minuten vorhanden. Die 0,1 cc der ersten Lösung hatten 112 counts pro 4 Minuten, d.h. minus "Hintergrund" 67, oder 670 pro cc. Die zweite Lösung ohne Zitrat wies 45 counts pro 4 Minuten auf, - in andern Worten gesagt - war nicht radioaktiv.

Nachher wurden noch zwei Zentrifugengläschen der oben beschriebenen Mischungen hergestellt. Die überstehende Flüssigkeit von der Zitratmischung und die ganze wieder geschüttelte Calciumoxalat-Mischung wurden beide später zu Tierversuchen benutzt.

Von den acht Meerschweinchen, die vorerst für 12 Stunden nüchternd gehalten worden waren, bekamen zwei je 5 cc der oben beschriebenen klaren Zitratlösung per os und zwei andere dieselbe Menge intraperitoneal einverleibt. Von den vier verbleibenden Tieren bekamen zwei je 5 cc der oben beschriebenen Calciumoxalat-Mischung per os und andere zwei je 5 cc derselben Mischung auf intraperitonealem Weg zugeführt. Diejenigen Tiere, die per os gefüttert wurden, bekamen die Lösungen direkt durch eine gewöhnliche Spritze mit Hohlnadel und Gummischutz in den Oesophagus gespritzt; die andern, die die genannten Lösungen intraperitoneal bekommen sollten, wurden erst nach einer kurzen Aetherbetäubung gespritzt.

Die mit Zitratlösung injizierten Tiere lebten nach diesem Eingriff bloss noch 15 Minuten; für die zwei Tiere, die dieselbe Lösung per os bekamen, war die Lebensdauer nach der Aufnahme noch ca. eine Stunde. Nach dem Tode der Versuchstiere, welcher zufolge der durch Zitrat verursachten Entionisierung des Calciums eintrat, wurden die per os gefütterten Tiere seziert. Herz, Lunge, Leber und Milz wurden herausgenommen

und von jedem Tier diese Organe in einem Porzellantiegel verwahrt. Der Magen-Darmtrakt wurde nicht eröffnet, um eine Mischung seines Inhaltes mit den obgenannten Organen zu vermeiden. Von den mit Zitratlösung intraperitoneal injizierten Tieren wurden ohne Eröffnung des Peritoneums nur Herz und Lunge herausgenommen, wobei diese Organe eines jeden Tieres ebenfalls in einem Tiegel verwahrt wurden.

Diese 4 Tiegel wurden dann in einem Abzug ca. 3 Stunden mit Bunsenbrennern geglüht, bis nur noch die grau-weisse Asche, d.h. die anorganischen Salze übrig blieben. In einen jeden Tiegel wurden 10 cc einer 38 %-igen HCl-Lösung gegossen und alsdann erwärmt. Infolge Vorkommens kleiner schwarzer Partikelchen wurden die Lösungen durch feines Filtrierpapier in Reagensgläser filtriert. Von einem jeden klaren Filtrat wurden 0,5 cc in kleine Schalen pipetiert und nachher verdunsten gelassen. (Da diese schwach radioaktiven Calciumstrahlen Gewebe nicht penetrieren, musste so gehandelt werden.) Alle wurden dann mit dem Geigerzähler auf Radioaktivität gemessen. Die leere Messkammer mit einer leeren Schale wies 44 counts pro 4 Minuten auf. Diejenigen Schalen mit Resten von der verdunsteten HCl-Lösung der Aschen registrierten alle Radioaktivität: von den per os gefütterten Tieren 54 bzw. 61 counts per 4 Minuten und von den injizierten Tieren 59 bzw. 51 counts per 4 Minuten.

Die vier Kontrolltiere überlebten die Fütterung bzw. die intraperitoneale Injektion der radioaktiven Calciumoxalat-Mischung ohne Zitrat. Stuhl und Urin dieser Kontrolltiere wurden 2 1/2 Tage separat gesammelt und nach dieser Zeit wurden die Tiere mittels Aether getötet. Aehnliche Untersuchungen - wie bereits oben angeführt - an Herz, Leber, Milz und Lunge wurden ebenfalls gemacht; jedoch zeigten diese Organe in den letzteren Fällen keine Radioaktivität.

Ebenso wurde ein Femur eines jeden Kontrolltieres wegpräpariert, im Porzellantiegel mit Bunsenbrenner geglüht, wobei hernach die Aschen mit 10 cc einer konzentrierten HCl-Lösung gelöst wurden. Der Inhalt wurde zufolge Vorkommens kleiner schwarzer Partikelchen filtriert. Von dem klaren Filtrat wurden je 1,0 cc in kleine Schalen pipetiert, verdunsten gelassen und auf Radioaktivität geprüft. Es konnte in den Knochen überhaupt keine Radioaktivität gemessen werden.

Der Urin von den mit der Calciumoxalat-Mischung per os gefütterten, sowie von den intraperitoneal injizierten Tieren wurde ebenfalls in ähnlicher Weise auf Radioaktivität geprüft, registrierte aber keine Aktivität mit dem Geigerzähler, d.h., nicht mehr Aktivität als diejenige in der leeren Messungskammer.

Der Stuhl der Kontrolltiere wurde nach drei Stunden Glühens ebenfalls auf Radioaktivität geprüft. Der von den zwei per os mit Calciumoxalat-Mischung gefütterten Tiere stammende Stuhl erwies sich im Geigerzähler als stark radioaktiv; derjenige von den zwei intraperitoneal gespritzten Tieren ergab ein negatives Resultat auf Radioaktivität.

Bei der Eröffnung des Peritoneums der mit Calciumoxalat intraperitoneal gespritzten Tiere konnte man an der Leber und zwischen den Darmschlingen einen weissen Niederschlag feststellen. Es wurden kleine Stückchen entfernt und auf Radioaktivität geprüft. Sie waren in der Tat stark radioaktiv und erwiesen sich dadurch als Calciumoxalat. (S. Tabelle II)

TABELLE II

Resultate der Versuche mit radioaktiver Calciumoxalat-Suspension und Calciumoxalat-Zitrat-Lösung

Tier	Verabreichung	Lösung oder Suspension	Radioaktivität (+ = pos.; - = neg.)				
			Stark blut-haltige Organe	Femur	Stuhl	Urin	Niederschlag im Peritoneum
1	per os	Calcium-oxalat-zit.	+				
2	"	"	+				
3	"	Calcium-oxalat	-	-	+	-	
4	"	"	-	-	+	-	
5	intra-perit.	Calcium-oxalat-zit.	+				
6	"	"	+				
7	"	Calcium-oxalat	-	-	-	-	+
8	"	"	-	-	-	-	+

ZUSAMMENFASSUNG

Die Anwendung von radioaktiven Isotopen ermöglicht eine genaue und elegante Prüfung vieler biologischer Reaktionen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, mit nicht aktiven Calciumlösungen und auch mittels Ca^{45}-Lösungen, dass eine genügende Menge von Natriumzitrat einen Niederschlag von Calciumoxalat wieder in Lösung zu bringen vermag. Nach Fällung einer $Ca^{45}Cl_2$-Lösung mit Oxalat wurde der Niederschlag mit Zitrat wieder in Lösung gebracht, und diese klare Lösung zeigte auch nach Filtration Radioaktivität. In Kontrollversuchen, in denen NaCl-Lösung zu einem Calciumoxalat-

Niederschlag zugefügt wurde, und die ganze Mischung geschuttelt, filtriert und dann auf Radioaktivität geprüft wurde, war die Aktivität null. In andern Worten wurde nur mit Zitrat und nicht mit NaCl ein Niederschlag von Calciumoxalat wieder in Lösung gebracht.

Auch ist es möglich, durch Zusatz von Zitrat zu einer Calciumlösung (das Calcium wird dadurch entionisiert) einen Niederschlag nach einem weiteren Zusatz von Oxalat zu verhüten. Es wurde gezeigt, dass, wenn zu einer Ca^{45} Cl_2-Lösung genügendes Ammoniumoxalat zugefügt wird, alles Ca^{45} als Calciumoxalat niedergeschlagen wird. Nach Filtration ist das Filtrat nicht mehr radioaktiv. Wenn aber Zitrat vor der Zugabe von derselben Menge Oxalat schon vorhanden war, ist nach Filtration in diesem Falle eine Radioaktivität im klaren Filtrat noch vorhanden. Das zeigt, dass Calcium noch in Lösung ist.

Die Resorbierbarkeit eines Calciumoxalat-Zitratkomplexes durch die Darmwand, bzw. die Kapillaren, wurde auch in Versuchen mit Meerschweinchen geprüft. Von acht Tieren bekamen zwei eine Mischung von Calciumoxalat per os und zwei andere dieselbe Mischung intraperitoneal. Von den anderen vier Tieren bekamen zwei eine bestimmte Menge Calciumoxalat-Zitratlösung per os, und der Rest dieselbe Lösung intraperitoneal. Von allen Tieren, die diese letzte Lösung bekamen, wurden nach dem spontan aufgetretenen Tode (nach 1/4 resp. 1 Stunde) der Tiere die stark bluthaltigen Organe (Herz, Leber, Milz, Lunge) auf Radioaktivität geprüft. Alle zeigten eine Radioaktivität. Resorption des Calciumzitratkomplexes in den für ca. 12 Stunden nüchtern gehaltenen Versuchstieren fand ziemlich schnell statt, und an der durch Uebermass von Zitrat verursachten Entionisierung des Blutcalciums starben die Tiere in ca. 1/4 Stunde an tetanischen Erscheinungen. Es musste also eine Resorption von radioaktivem Calcium stattgefunden haben, um eine Radioaktivität im Blute zu erzeugen. Da das schwerlösliche Calciumoxalat gewöhnlich vollständig unresorbierbar ist, was auch in den Kontrollversuchen gezeigt wurde, hatte das Zitration eine Wirkung auf das Calcium im Sinne einer Bildung eines Komplexions, was einen Niederschlag mit Oxalat unmöglich macht. Infolge dieser Wirkung des Zitrates war eine Resorption des Calciumoxalats durch die Darmwand bei den per os gefütterten Tieren und durch die Blutkapillaren bei den intraperitoneal gespritzten Tieren möglich.

Von den Tieren, die Calciumoxalat Suspension per os bekamen, wurden nach dem Tode der Tiere stark bluthaltige Organe, Femora, Stuhl und Urin auf Radioaktivität geprüft. Keine Radioaktivität wurde in den stark bluthaltigen Organen dieser Tiere nachgewiesen, aber in dem Stuhl konnte fast all das gefütterte radioaktive Calciumisotop nachgewiesen werden. Femora und Urin waren negativ auf Radioaktivität, was zeigt, dass kein Calciumoxalat resorbiert wurde und alles ausgeschieden war. Bei denjenigen Versuchstieren, die eine Calciumoxalat-Mischung auf intraperitonealem Weg zugeführt bekamen, blieb praktisch alles eingespritzte radioaktive Calcium in der Peritonealhöhle in Form eines kleinen weissen Niederschlages. Knochen und Urin

dieser Tiere zeigten keine Aktivität. In andern Worten gesagt heisst das, dass das Calciumoxalat durch die Darmwand bzw. die Kapillaren nicht resorbiert wurde.

Die Möglichkeit existiert, dass andere Anionen, welche mit Calcium unlösliche Salze bilden, die Resorption und damit den Gebrauch dieses nötigen Ions verhindern. In diese Kategorien kommen als Beispiele, ausser dem Oxalat, das Phosphat, das Carbonat und das Sulfat.

In weiteren Tierversuchen mit der Calciumoxalat-Zitrat-Komplexbildung wurde eine Resorption derselben durch die Darmwand bzw. die Kapillaren demonstriert. Ueber das weitere Schicksal des einmal in die Blutbahn eingegangenen Calciumzitrat-oxalat-Komplexes kann man sich nach diesen Versuchen noch keine Vorstellungen machen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass der Komplex ebensolche Wirkungen aufweist, wie die anderen einfacheren Calciumverbindungen. Durch eigene Tierversuche wurde gezeigt, dass durch Injektion bzw. Fütterung minimaler Mengen von Calciumisotop Ca^{45} in Form von Calciumoxalat-zitrat ein Teil des radioaktiven Calciums in den Knochen abgelagert wird.

Ob die Heilung der klinischen und experimentellen Rhachitis durch das Zitration auf der Bildung von löslichen Komplexsalzen mit konsekutiv besserer Calciumresorption beruht, oder aber auf einer besseren Verwertung des Calciums durch das Osteoidgewebe, ist durch obige Versuche nicht entschieden.

Es ist mir eine sehr angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. med. K. Lenggenhager, Direktor der chirurgischen Klinik der Universität Bern, sowohl für die Ueberlassung des Themas wie für seine liebenswürdigen Ratschläge und Leitung meinen besten Dank auszusprechen.

Für das radioaktive Isotop, die Benützung des entsprechenden Laboratoriums, sowie für die intensive Hilfe und viele Geduld während der Arbeit, bin ich Herrn P.D. Dr. phil. W. Minder, Direktor des Radiuminstitutes der Universität Bern, zu herzlichem Dank verpflichtet.

LITERATUR

1. Hastings, A.G., Murray, C.D., und Sendroy, J., Jr.: J. Biol. Chem., 71: 723, (1927)
2. Shohl, A.T.: J. Nutrition, 14: 69, (1937)
3. Shohl, A.T., und Butler, A.M.: New England J. Med., 220: 515, (1939)
4. Hathaway, M.L., und Meyer, F.L.: J. Nutrition, 17: 419, (1939)
5. Rominger, E.: Arch. f. Kinderheil. 131: 53, (1944)
6. Glanzmann, E., Meier, K., und Walthard, B.: Ztschr. f. Vitaminforsch., 17: 159, (1946)
7. Day, H.G.: J. Nutrition, 20: 157, (1940)
8. Watson, E.K., McGuire, E.W., Meiyer, F.L., und Hathaway, M.L.: J. Nutrition, 30: 259, (1945)
9. Steggerda, P.R., und Mitchell, H.H.: J. Nutrition, 31: 423, (1946)
10. Mallon, M.G., und Jones, E.M.: J. Am. Diet. Assn., 28: 939, (1952)
11. Mallon, M.G., und Lord, D.J.: J. Am. Diet. Assn., 18: 303, (1942)
12. Mallon, M.G., und Rosenblatt, R.: J. Am. Diet. Assn., 22: 673, (1946)
13. Gordonoff, T. und Minder, W.: Inter. Ztschr. f. Vitaminforsch., 23: 16, (1951)
14. Gordonoff, T., und Minder, W.: Inter. Ztschr. f. Vitaminforsch., 23: 504, (1952)
15. Theopold, W. und Hennig, W.: Monatschr. f. Kinderheilkunde, 97: 462, (1949)
16. Hennig, W., und Theopold, W.: Ztschr. f. Kinderheilkunde, 69: 55, (1951)
17. Schmahl, F., und Hennig, W.: Z. anorg. Chemie, 216: 135, (1950)
18. Glanzmann, E., Meier, K., und Uehlinger, E.: Ztschr. f. Vitaminforsch., 17: 130, (1946)
19. Fairbanks, B.W., und Mitchell, H.H.: J. Nutrition, 16: 79, (1938)
20. Hoover, A.A., und Karunairatnam, M.C.: The Biochem. J., 39: 237, (1945)
21. Andrews, J.C., und Viser, E.T.: Food Research, 16: 306, (1950)
22. Bonner, P., Hummel, F.C., Bates, M.F., Horton, J., Hunscher, H.A., und Macy, I.G.: J. Pediatrics, 12: 188, (1938)
23. Johnston, F.A., McMillan, T.J., und Falconer, G.D.: J. Am. Diet. Assn., 28: 933, (1952)
24. Lovelace, F.E., Liv, C.H., und McCay, C.M.: Archives of Biochem., 27: 48, (1950)
25. Crowell, G.E., und Turner, N.C.: J. of Dent. Research, 28: 499, (1949)